

(8)

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-135836

(43)Date of publication of application : 17.05.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/70  
A61K 31/70  
// C07H 15/256

(21)Application number : 04-290509

(71)Applicant : MINOFUAAGEN SEIYAKU HONPO:GOUSHI

(22)Date of filing : 28.10.1992

(72)Inventor : SUZUKI FUJIO  
PORAADO BIRUDO RICHIIYAADO  
KOBAYASHI MAKIKO  
UTSUNOMIYA TOKUICHIRO  
UTSUNOMIYA KYOZO

(54) INDUCER FOR CONTRA-SUPPRESSOR CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an inducer for contra-suppressor cell and a therapeutic agent for low immunopathy.

CONSTITUTION: Glycyrrhizin as an active ingredient is mixed with a base of medicine. When an inducer for contra-suppressor cell thus obtained is administered, a contra-suppressor cell is induced. The induced contra-suppressor cell suppresses eruption of inhibitory suppressor cell, a main cause for low immunopathy and its action and alleviates and treats opportunistic infective disease.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 20.10.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 24.05.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

JPO and NCIP I are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The inducer of the contra suppressor cell which makes glycyrrhizin an active principle.

[Claim 2] The therapy agent of low \*\*\*\*\* which makes an active principle the glycyrrhizin through induction of a contra suppressor cell.

[Claim 3] The inducer of a contra suppressor cell according to claim 1 used in order to carry out prevention or a therapy for an opportunistic infection by guiding the contra suppressor cell in healthy people, acquiring this contra suppressor cell, and importing into a patient.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the inducer and the therapy agent of low \*\*\*\*\* of a contra suppressor cell.

[0002]

[Description of the Prior Art] Low \*\*\*\*\* by the activity of the transplantation refusal agent after fundamental diseases, such as cancer, stress, a large injury and a burn, and an organ transplantation or often being induced at the time of aging etc. is known (a Sir jelly (Surgery) — 156 and 233 (1983) —) immunology Today (Immunology Today) — 11 and 170 (1990) — an ADOBAN tin Inn host defense mechanism (Advances in Host defense Mechanisms) — 6 and 81 (1986) — transformer plantation proceedings (Transplantation Proceedings) — 23 and 2175 — and (1991) ADOBAN tin Inn immunology (Advances in Immunology) — 29, 287 (1980), etc.

[0003] Moreover, AIDS from which the infection by microorganisms, such as bacteria and a virus, itself serves as a cause of low \*\*\*\*\*, and it poses a big problem in recent years is a remarkable example which low \*\*\*\*\* is induced. by the way, out of the patient's serum which lapsed into low \*\*\*\*\* by cancer, a burn, etc. It compares with an amount. Usually, the prostaglandin E 2 (123 ACHIBUSU OBU sir jelly (Archives of Surgery) 293 (1988)) of a clearly high amount, A steroid (5 journal OBU barn care rehabilitation (Journal of Burn Care Rehabilitation) 143 (1984)), The immunosuppressive agent of various acidity or alkalinity, such as transformation growth factor-beta (journal OBU clinical NOMUNOROJII (Journal of Clinical Immunology) 11 and 95 (1991)), is found. It can be presumed that these serve as a cause of low immunity \*\*\*\*\*.

[0004] In the patient of low \*\*\*\*\* [ these ], furthermore, interferon production ability (129 THE journal OBU immunology (The Journal of Immunology) 1806 (1982)), Interleukin 2 production ability (65 clinical experimental immunology (Clinical Experimental Immunology) 570 (1986)), Or a cell murder operation of thymus-derived cell dependence (33 transformer plantation (Transplantation) 422 (1982)), the suppressor cell (a control macrophage and a control T lymphocyte —) which has the function to make immunoreactions (1984), such as a cell murder operation (86 cellular immunology (Cellular Immunology) 551) of spontaneous killer cell dependence, fall A control B lymphocyte appears and the role important for low immunity \*\*\*\*\* is presented.

[0005] For example, the data that a suppressor cell controls a host's neoplasm resistance remarkably are obvious in the experiment using North's and others (159 journal OBU experimental medicine (Journal of Experimental Medicine) 1295 (1984)) cancer-bearing mouse. That is, it is Meth A at the allograft system of a mouse. Although the antitumor effector cell which manages concomitant immunity with a peak of the nine-day back of an after [ transplantation ] is detected when a neoplasm is used, after that, the activity of an effector cell is eliminated with the advent of a suppressor cell, and growth of the still more intense neoplasm as the result advances.

[0006] On the other hand, in order to control the rejection to the transplanted organ in the case of an organ transplantation Cyclosporin A (23 transformer plantation proceedings (Transplantation Proceedings) 2180 (1991)), Immunosuppresants (1985), such as OKT3 (the THE new British journal OBU medicine (The New England Journal of Medicine) 313 and 337), are developed. Since it can use by the clinical field, a transplant patient's survival time is elongated certainly.

[0007] By however, these immunosuppressants Control of a T cell (THE journal OBU immunology ()) [ The ] Journal of Immunology Induction (71 clinical – and – experimental immunology (Clinical and Experimental Immunology) 369 (1988)) of 128, 355 (1982), or a suppressor T cell is \*(ed). A patient's cellular immunity falls notably as the result, it becomes impossible to eliminate even with a normal bacterial flora or air saprophytic bacteria soon, and, in many cases, a patient dies of septicemia etc.

[0008] With the burn, although the direct death by the physical breakage can almost be avoided by advance of present age curative medicine including exhalation, moisture management, etc., it poses the problem that the death by the septicemia from which the opportunistic infection concurred with by low \*\*\*\*\* becomes a cause is big.

[0009] Since the infection susceptibility over the Herpes virus of the imported mouse increased notably when the suppressor cell of the burn mouse origin was imported into the mouse non-burning itself, depending for lifting of the infection susceptibility over a burn host's herpesvirus infection on the suppressor T cell which exists in the burn mouse spleen was confirmed.

[0010] In the animal experiment which KUPPA and others (38 journal OBU surge cull research (Journal of Surgical Research) 606 (1985)) conducted using the septicemia model, import of a suppressor cell (Lyt2+ T cell) raised 15% of average death rates in this model even to 92%. Moreover, when the single antibody to the repressor which a suppressor cell produces in this case was simultaneously prescribed for the patient, lifting of such the death rate was not accepted. If this data clarifies importance in opportunistic infection induction of a suppressor cell and work of a suppressor cell and its meltable sex factor is prevented further, it will tell that a burn host's resistance to infection can be pulled back even in the condition of not burning oneself.

[0011]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In order to remove the suppressor cell used as the cause from low immunity \*\*\*\*\*, Until now X-ray irradiation (16 cancer immunology – and – immuno therapy (Cancer Immunology and Immunotherapy) 175 (1984)), TOPIKARU Cerium Nitrate (99 Sir jelly (Surgery) 53 (1986)), Mel FERAN (20 cancer immunology – and – immuno therapy (Cancer Immunology and Immunotherapy) 209 (1985)) and SAIKURO phosphor MAIDO (Nature (Nature)) The alkylating agent of 262, 77, etc. (1976), Cimetidine (THE journal OBU trauma ()) [ The ] 2 mold acceptor inhibitor of histamines (1984), such as journal of Tnauma 25, 131 (1985), and ranitidine (132 THE journal OBU immunology (The Journal of Immunology) 3054), The indomethacin which shows prostaglandin E 2 production inhibitory action (journal OBU biological response MODIFAIYAZU (Journal of Biological Response Modifiers) 7 and 568 (1988)), Aspirin (38 British journal OBU cancer (British Journal of Cancer) 503 (1978)), Non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as ibuprofen (97 Sir jelly (Surgery) 721 (1985)), In addition, polymixin B (10 journal OBU barn care rehabilitation (Journal of Burn Care Rehabilitation) 213 (1989)), Aclacinomycin A (10 immuno pharmacology (Immunopharmacology) 19 (1985)), HEPATAMI Norian AMP (48 the Japan journal OBU pharmacology (Japan Journal of Pharmacology) 417 (1988)) Pro KAINAMIDO (11 clinical – and – IMBESU tee gay TIBU OBU medicine (Clinical and Investigative of Medicine) 425 (1988)), A lipid A derivative (56 infection – and – immunity (Infecton and Immunity) 1076 (1988)), Many (1980) approaches, such as—432 (26 International journal OBU cancer (International Journal of Cancer) 401), and the matter have been taken up in a various experiment system.

[0012] However, a certain amount of [ the conventional approach developed in order to remove a suppressor cell ] effectiveness can be evaluated, all of a thing are still imperfect and development of the other effective approaches is desired strongly.

[0013] By the way, the contra suppressor cell which is a blocker cell of a suppressor cell is reported as what controls the activity of a suppressor cell absolutely effectively (42 ADOBAN cis- Inn cancer research (Advances in Cancer Research) 277 (1984)). This contra suppressor cell shows higher efficacy to the opportunistic infection of 1 mold herpesvirus (HSV-1) by which a suppressor cell is induced owing to. For example, one day before making a burn mouse carry out abdominal cavity infection of HSV-1 of the amount of 10 fifty percent lethal doses, when the contra suppressor cell was imported from the vein, 95% of the burn mouse survived.

[0014] This invention makes it a technical problem to offer therapy agents of low \*\*\*\*\*, such as relief or a therapy agent of the inducer of a contra suppressor cell, and an opportunistic infection, for the purpose of removing a suppressor cell, in order to be made from the above-mentioned viewpoint

and to mitigate and treat the opportunistic infection of low immunity \*\*\*\*\* etc. effectively.

[0015]

[Means for Solving the Problem] this invention person resulted in a header and this invention that it has, and glycyrrhizin could mitigate an opportunistic infection and could treat the operation which guides a contra suppressor cell by the guided contra suppressor cell, as a result of inquiring wholeheartedly, in order to solve the above-mentioned technical problem.

[0016] That is, this inventions are the inducer of the contra suppressor cell which makes glycyrrhizin an active principle, and a therapy agent of low \*\*\*\*\* which makes glycyrrhizin an active principle.

[0017] Hereafter, this invention is explained to a detail.

The inducer of <1> contra suppressor cell, the inducer of the contra suppressor cell of therapy agent this invention of low \*\*\*\*\*, or the therapy agent of low \*\*\*\*\* makes glycyrrhizin an active principle.

[0018] Glycyrrhizin is the saponin of the glycyrrhiza origin, it has the structure which dyad glucuronic acid combined with the glycyrrhetic acid of one molecule, and it is the description that acute and chronic toxicity are very low. moreover, the operation which glycyrrhizin makes increase the immunomechanism of hosts, such as interferon gamma production ability, the antitumor effectiveness discovered through a host function, and the anti-virus effectiveness — having — as the remedy of the chronic hepatitis — current — it is used by the large clinical field.

[0019] In this invention, it can consider as the powder which blended a harmless kind permitted on medicine manufacture or several sorts of excipients, for example, a lactose, potatostarch, sodium alginate or aminoacetic acid, threonine, a calcium carbonate, etc. as a pharmaceutical form, a granule, a sugar-coated tablet, and a capsule. In the case of injections, a solvent may only add amino acid, such as injection distilled water, a physiological saline, or detoxication aminoacetic acid.

[0020] Glycyrrhizin can be used suitable for this invention, although the physiological saline solution which added the cysteine and the glycine is known as pharmaceutical preparation for injection.

[0021] the dose of the inducer of the contra suppressor cell of <2> direction-for-use this invention — internal use — an adult — 200-400mg per day, and parenteral administration — an adult — expected effectiveness is expectable by using in 10-200mg per day.

[0022] Moreover, in a serious patient, even if it prescribes the inducer or the therapy agent of low \*\*\*\*\* of a contra suppressor cell of this invention for the patient, effective induction of a contra suppressor cell may not be expectable. In such a case, an opportunistic infection can be mitigated and treated by transfusing the blood which medicates healthy people with a contra suppressor cell inducer, and contains the guided contra suppressor cell into low immunity \*\*\*\*\*, or carrying out the active transfer of the lymphocyte fraction.

[0023]

[Function] Below, an operation of the inducer of the contra suppressor cell of this invention and the therapy agent of low \*\*\*\*\* is explained.

[0024] An animal experiment explains a contra suppressor cell induction operation of the contra suppressor cell inductive effect glycyrrhizin of <1> glycyrrhizin.

[0025] A contra suppressor cell is BISHIA. VIROSA It is that which has the property to adhere to lectin (VV lectin) specifically (11 European journal OBU immunology (European Journal of Immunology) 937 (1981)), and change of the number of VV lectin adhesion cells of a glycyrrhizin administration animal was investigated.

[0026] It added on the plastics petri dish with a diameter of 9cm which performed VV lectin (0.5microg [ // ml ], 2 hours) processing, and the mouse 48 hours after carrying out intraperitoneal (i. p.) administration of the glycyrrhizin, a rat, and 37 degrees C (5x10<sup>7</sup> pieces) of guinea pig origin splenic lymphocytes were cultivated for 45 minutes. After removing a lectin non-adhesion cell, by adding N-acetyl D-galactosamine (1mg/(ml)) on a petri dish, and continuing culture for 15 more minutes, VV lectin adhesion cell was removed from the plate, and the viable count was measured by the erythrocytometer by the trypan blue staining technique. A result is shown in a table 1.

[0027]

[A table 1]

	用量 (mg/kg)	投与 経路	動物	付着細胞数 ( $\times 10^4$ /動物)	付着率 (%)
実験1					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×1	ip	マウス	150	15
実験2					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	0.1×1	ip	マウス	100	10
	100 ×1	ip	マウス	200	20
実験3					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×1	sc	マウス	150	15
	10×1	iv	マウス	150	15
	10×1	po	マウス	150	15
実験4					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×1	ip	マウス	100	10
	10×5	ip	マウス	150	15
	10×10	ip	マウス	200	20
実験5					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×2	ip	マウス	200	—
強ミノC	10×2	ip	マウス	200	20
実験6					
コントロール			ラット	<1	—
グリチルリチン	10×2	ip	ラット	1000	20
実験7					
コントロール			モルモット	<1	—
グリチルリチン	10×2	ip	モルモット	3200	20

[0028] The remarkable increment in VV lectin adhesion cell was accepted into the splenic lymphocyte of the glycyrrhizin administration mouse origin so that clearly from this result. Moreover, most VV lectin adhesion cells were not detected by the physiological saline administration group of contrast. From this, it was checked that a contra suppressor cell is guided into a splenic lymphocyte by glycyrrhizin administration.

[0029] In the amount of 0.1 - 100 mg/kg, the same result was accepted in the rat or the guinea pig, intraperitoneal, s.c. (hypodermically), or also when p.o. (taking orally) administration of was done. Moreover, when the repetitive administration of glycyrrhizin was tried, it was admitted that a lectin adhesion cell increased depending on the count of administration of drugs.

[0030] The operation whose contra suppressor cell controls the suppressor cell induced by Con A at the beginning of the operation over the operation (1) Con A induction suppressor cell which controls the suppressor cell by the contra suppressor cell guided by <2> glycyrrhizin was investigated using the mixed-lymphocyte-culture (MLR) system.

[0031] The suppressor cell (Lyt2 T cell) was guided by cultivating  $1 \times 10^6$  BALB/c mouse (H-2d) origin splenic lymphocytes/ml by 24microg [/ml] concanavalin A (Con A) for 48 hours (AKUTA PASOROJKA micro biotechnology ROJKA immuno ROJKA Scandinavia (Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica, Scandinavia, section C, 9, and 277 (1982))).

[0032] The splenic lymphocyte (contra suppressor cell) obtained from the BALB/c mouse which carried out glycyrrhizin administration (10 mg/kg, i.p.) to the reaction cell (a BALB/c mouse origin lymphocyte, 1x10<sup>5</sup> pieces / hole) and the suppressor cell obtained in the one direction MLR of a stimulus cell (C57BL / 6 mouse origin lymphocyte) was added by the ratio of 2:2:1:2 using 96 hole microplate, and it cultivated in five days and within the 5%CO<sub>2</sub> incubator at 37 degrees C.

[0033] After adding the tritiated thymidine (3 H-TdR) of 1microcurie / hole 24 hours before culture termination, operation control of a suppressor cell was investigated by measuring the amount of incorporation of 3 H-TdR to a reaction cell with a liquid SHINCHIRESHON counter. The rate of control obtained by the following type was shown in drawing 1.

[0034] Rate (%) of control =  $[1 - (\text{CPM of group which added glycyrrhizin administration mouse origin splenic lymphocyte to CPM/suppressor cell of suppressor cell addition group})] \times 100$  [0035] of suppressor cell activity Consequently, the splenic lymphocyte obtained from the mouse which prescribed glycyrrhizin for the patient checked the control activity of MLR induced by ConA 50 to 70%. It accepted also by the glycyrrhizin administration mouse origin liver lymphocyte or the non-\*\*\*\* blood medium lymphocyte, and in the glycyrrhizin of 0.1 - 100 mg/kg, the same result was checked by the rat and the guinea pig, s.c., i.v., and also when p.o. administration of was done.

[0036] (2) The operation whose contra suppressor cell controls a suppressor cell was investigated using the depressant action to a burn induction suppressor cell, next the suppressor cell induced by the burn.

[0037] The one direction MLR was performed by three persons of the BALB/c mouse origin splenic lymphocyte (six days after a burn and 1x10<sup>6</sup> individual) which burned itself (30% of surface area of a body, and 3 times), an affiliated mouse origin splenic lymphocyte (a reaction cell, 1x10<sup>5</sup>), and a different \*\* mouse (C57BL/6) origin splenic lymphocyte (stimulus cell), and the suppressor cell activity which controls MLR was investigated (19 immunology Letters (Immunology Letters) 33 (1988)). Furthermore, in order to measure the activity of a contra suppressor cell, the splenic lymphocyte obtained from the glycyrrhizin administration (10 mg/kg, i.p.) mouse was added and cultivated by the ratio of 1:1:10:10: to the reaction cell, the stimulus cell, and the suppressor cell.

[0038] After cultivating like the above-mentioned, operation control of a burn induction suppressor cell was measured by measuring the amount of 3 H-TdR to a reaction cell. The rate of control is shown in a table 2.

[0039]

[A table 2]

反応細胞と刺激細胞が 混合培養された細胞	抑制率 (%)
正常マウス由来脾リンパ球 (NSMNC)	—
火傷マウス由来脾リンパ球 (BSMNC)	8 0
グリチルリチン投与正常マウス由来脾リンパ球 (GR NSMNC)	—
グリチルリチン投与火傷マウス由来脾リンパ球 (GR BSMNC)	2 7
NSMNC + GR BSMNC	—
BSMNC + GR BSMNC	3 0

[0040] Consequently, the activity of a burn induction suppressor cell was prevented 50 to 80% by the splenic lymphocyte obtained from the mouse which prescribed glycyrrhizin for the patient. That is, the contra suppressor cell was guided into glycyrrhizin administration mouse origin splenic cells, and the operation of a suppressor cell was controlled by this contra suppressor cell.

[0041] From the above result, it was shown that a contra suppressor cell has the operation controlled also to the suppressor cell induced by any of Con A and a burn.

[0042] It was burned to the suppressor cell appearance inhibition operation BALB/C mouse to the suppressor cell appearance inhibition operation (1) burn animal by <3> glycyrrhizin (30% of surface area

of a body, and 3 times), and intraperitoneal administration (10mg/(kg)) of the glycyrrhizin was carried out two days and four days after. The one direction MLR was performed for the splenic lymphocyte daily obtained from the glycyrrhizin burn mouse of glycyrrhizin administration or not prescribing a medicine for the patient by three persons of an affiliated mouse origin splenic lymphocyte (reaction cell) and a different \*\* mouse origin lymphocyte (stimulus cell). To the reaction cell (1X10<sup>5</sup> pieces), MLR mixed the glycyrrhizin administration burn mouse origin splenic lymphocyte with the stimulus cell by the ratio of 1:1:10, and performed it in five days and within the 5%CO<sub>2</sub> incubator at 37 degrees C. The rate of control was computed like the above and it was shown in drawing 2.

[0043] Consequently, from the 4th day of a burn, the splenic lymphocyte (O) obtained from the glycyrrhizin burn mouse non-prescribing a medicine for the patient with time began to control MLR intentionally, and the activity reached the peak on the 6th day of a burn (60 – 80% control), and, 11 days after, it disappeared. It did not pass over the another side glycyrrhizin administration burn mouse origin splenic lymphocyte (–) to carry out control (six days after a burn) of the same MLR 30% at the maximum, but the activity of burn induction was notably prevented by glycyrrhizin.

[0044] Moreover, since the effectiveness of such a splenic lymphocyte disappeared when VV lectin adhesion cell was removed, it was checked by the result that the activity of a suppressor cell was low, with the glycyrrhizin administration mouse that it is a thing resulting from the contra suppressor cell having been guided by glycyrrhizin.

[0045] (2) If immunity of the suppressor cell inhibition effectiveness BALB/c (H-2d) mouse guided by alloantigen is carried out by 5x10<sup>7</sup> EL-4 tumor cells (H-2d) per mouse, the suppressor cell of alloantigen reactivity will be guided. The ARORIMPA ball was imported by the same approach as the BALB/c mouse which prescribed glycyrrhizin for the patient (10 mg/kg, i.p.), and the obtained splenic lymphocyte was added in the MLR system. The amount of an alloantigen reactivity suppressor cell was measured by measuring the amount of 3 H-TdR to a reaction cell after culture.

[0046] Consequently, when an ARORIMPA ball was transplanted, the activity of a suppressor cell was detected from the 3rd day of import (30 – 50% control), and disappeared by (70 – 80% control) and the 9th with a peak of the 5 – 7th day. When the ARORIMPA ball was transplanted by the same approach as the mouse processed by the glycyrrhizin of 10 mg/kg, as for the rate of control of a suppressor cell, at least the 5th day which suppressor cell activity is not detected like \*\*\*\*, but is believed to be a peak was only 20 – 40%.

[0047] That is, it was confirmed that glycyrrhizin has not only a burn but the operation which prevents an appearance also to the suppressor cell guided by alloantigen. this data is already announced by the journal — \*\*\*\* (medical Ayumi, 158 volumes, 135page (1991)) — it is not indicated that the intervention of a contra suppressor cell and a contra suppressor cell are guided by glycyrrhizin.

[0048] (3) They are 1x10<sup>5</sup> Meth A per mouse to the left abdomen of the suppressor cell appearance inhibition operation BALB/c mouse in a tumor bearing animal. Even if it transplants the tumor cell of tales doses to a right abdomen again seven – ten days after transplanting a tumor cell, growth of a secondary transplantation neoplasm is not accepted for concomitant immunity. On the other hand, if the replantatio of a neoplasm is tried on the conditions that it is the same 20 days after transplantation, concomitant immunity will be destroyed by the work of a suppressor cell which appeared with growth of a neoplasm, and growth of a secondary transplantation neoplasm will be accepted (159 journal OBU experimental medicine (Journal of Experimental Medicine) 1295 (1984)).

[0049] The splenic cells obtained from another mouse which carried out the frequent administration of the glycyrrhizin (10 mg/kg, i.p.) by the same experiment system on the 7th for which the primary tumor cell was transplanted were imported, and the activity of the suppressor cell in the splenic lymphocyte obtained from the cancer-bearing mouse the 13 days after was measured by MLR.

[0050] It is 1x10<sup>5</sup> hypodermically [ inguinal region ]. The splenic cells (per [ 1x10<sup>8</sup> ] mouse individual) obtained by the affiliated normal mouse by glycyrrhizin administration (10 mg/kg, i.p., every other day 2 times) were imported into the BALB/c cancer-bearing mouse on the 7th which transplanted the Meth A neoplasm of an individual from the vein. In addition, similarly the splenic cells obtained from the normal mouse by the mouse seven days after cancer-bearing were imported into the control group. The suppressor cell activity of the cancer-bearing mouse origin splenic lymphocyte obtained on the 20th day of neoplasm transplantation, respectively was measured by the one direction MLR of culture for five days like aforementioned <3> (1). A result is shown in a table 3.



[0051]

[A table 3]

反応細胞と刺激細胞が 混合された細胞	MLR に対する抑制率 (%)
正常マウス由来脾細胞を移入された 担癌マウス脾リンパ球	80
グリチルリチン投与マウス由来脾細胞を移入された 担癌マウス脾リンパ球	20

[0052] Consequently, by it of the cancer-bearing mouse imported in glycyrrhizin administration mouse origin splenic cells, MLR was controlled only 20% to the glycyrrhizin cancer-bearing mouse origin splenic lymphocyte non-prescribing a medicine for the patient having controlled MLR 80%.

[0053] That is, in glycyrrhizin administration mouse origin splenic cells, the operation which eliminates the suppressor cell guided by primary neoplasm transplantation exists. However, since the activity was also lost when VV lectin adhesion cell was removed from the splenic cells concerned, it was checked that the suppressor cell depressant action by glycyrrhizin is the phenomenon produced through induction of a contra suppressor cell.

[0054] HSV-1 was infected with the mouse immediately after the burn which investigated the operation of the glycyrrhizin to HSV-1 infection of the infection relief operation burn animal by <4> glycyrrhizin induction contra suppressor cell, administration or a glycyrrhizin induction contra suppressor cell was simultaneously imported for glycyrrhizin (10 mg/kg, i.p.), and survival of a mouse was observed.

[0055] 2 hours after burning oneself to a BALB/c mouse (30% of surface area of a body, and 3 times), the contra suppressor cell (1x10<sup>8</sup> pieces / mouse) guided by prescribing GURICHIRURICHIN for the patient (10 mg/kg x2, i.p.) was imported into the burn mouse from the vein. HSV-1 of the amount to which 95% of a burn mouse carries out infection death of the import of a burn mouse (O) and a contra suppressor cell to a carrier beam burn mouse (-) was infected with the abdominal cavity, and the mouse was observed for 15 days. A result is shown in drawing 3.

[0056] Consequently, 90% of the whole burn mouse escaped the infection death by HSV-1 by administration of glycyrrhizin. Moreover, when vein import of the contra suppressor cell guided to the same HSV-1 infection burn mouse by glycyrrhizin was carried out actively, the death rate fell to 10%. Since such activity disappeared when VV lectin adhesion cell fraction was removed before active import of splenic cells, it was confirmed that defense of the HSV-1 infection burn mouse by glycyrrhizin is the phenomenon produced through the contra suppressor cell guided by glycyrrhizin.

[0057] As explained above, glycyrrhizin has the operation which has the operation which guides a contra suppressor cell, and controls an operation of a suppressor cell through a contra suppressor cell, and prevents the appearance of a suppressor cell, and, as a result, has further the operation which prevents infection.

[0058] HSV-1 was infected with the mouse immediately after the infection therapy operation burn by <5> glycyrrhizin induction contra suppressor cell, the glycyrrhizin induction contra suppressor cell was imported the 24 hours after, and survival of a mouse was checked.

[0059] 2 hours after burning oneself to a BALB/c mouse, HSV-1 of the amount in which 95% of a burn mouse carries out infection death was infected with the abdominal cavity, the contra suppressor cell (1x10<sup>8</sup> pieces / mouse) guided by medicating a BALB/c normal mouse with glycyrrhizin the one day after (10 mg/kg, i.p.) was imported into the HSV-1 infection burn mouse from the vein, and the mouse was observed for 15 days. A result is shown in drawing 4.

[0060] Moreover, a spleen and liver were extracted 3, 4, and 5 days after infection, and the quantum of the amount of viruses in an organ was carried out by the plaque technique using a VERO cell. A result is shown in drawing 5 (A: a spleen, B:liver).

[0061] Consequently, 80% of burn mouse escaped the infection death by HSV-1 by import of a

glycyrrhizin induction contra suppressor cell ( drawing 4 ). Moreover, as for the infection burn mouse imported in the glycyrrhizin induction contra suppressor cell, the amount of viruses in the spleen after infection and liver was decreasing remarkably as compared with the non-importing group ( drawing 5 R> 5 ).

[0062] As explained above, an operation of a suppressor cell is controlled to the contra suppressor cell guided by glycyrrhizin, and it has in it the operation which treats infection as a result. In addition, also when the physiological saline solution which added the cysteine and the glycine to glycyrrhizin is used, it has the same operation as the above.

[0063] the description of the contra suppressor cell guided by <6> glycyrrhizin — the description of the contra suppressor cell guided by glycyrrhizin was investigated. The splenic lymphocyte obtained from the glycyrrhizin administration (10 mg/kg, i.p., every other day 2 times) mouse was processed by various single antibodies (4 degrees C, 40 minutes) and complement (37 degrees C, 40 minutes). An art is immunology Letters (the approach of Immunology Letters 19 and given in 33 page (1988) was followed.).

[0064] They are these processing cells (1x10<sup>6</sup> individual) and a burn induction suppressor cell (six days after a burn and 1x10<sup>6</sup> individual) for five days like <2 (1)> one-way of culture It added to MLR of a system and the inhibition activities to the activity of a suppressor cell were considered for the description against the index. Consequently, the contra suppressor cell guided by glycyrrhizin is susceptibility in CD3 and an L3 T—four single antibody, and it became clear to the Ly 2.2 single antibody that it was an insusceptibility and was a T cell CD3 electropositive, CD4 electropositive, and CD8 negative (table 4).

[0065]

[A table 4]

グリチルリチン誘発コントラ サプレッサー細胞の処理	火傷誘発抑制細胞 に対する制御率 (%)
補体のみ	7 5
anti CD3 単一抗体 + 補体	0
anti L3T4 単一抗体 + 補体	1
anti Lyt 1.2 単一抗体 + 補体	0
anti Lyt 2.2 単一抗体 + 補体	7 6
anti Ig 抗血清 + 補体	7 6
火傷誘発抑制細胞の処理	処理後に残存した 抑制細胞の活性 (%)
補体のみ	8 0
anti CD3 単一抗体 + 補体	1
anti L3T4 単一抗体 + 補体	8 1
anti Lyt 1.2 単一抗体 + 補体	8 2
anti Lyt 2.2 単一抗体 + 補体	2
anti Ig 抗血清 + 補体	7 8

[0066] In addition, it was the same even if it used the physiological saline solution which added the cysteine and the glycine to glycyrrhizin.

[0067] the description of the suppressor cell induced by <7> burns — after processing a day [ of a burn / 6th ] mouse origin splenic lymphocyte by the various single antibodies and complement to a cell

surface marker, MLR examined the description of a suppressor cell. Consequently, to CD3 and a Lyt 2.2 single antibody, it is susceptibility and, as for the burn induction suppressor cell, it became clear that it was an insusceptibility and was a T cell CD3 electropositive, CD4 negative, and CD8 electropositive at the L3 T-four single antibody (table 4). This is the same as that of the result already reported with the journal (journal OBU surge cull RESACHI (Journal of Surgical Research) 38 and 606 (1985)).

[0068] In addition, it was the same even if it used the physiological saline solution which added the cysteine and the glycine to glycyrrhizin.

[0069] After mixing the spleen contra suppressor cell and burn induction suppressor cell (six days after a burn) of the glycyrrhizin processing (10mg [ // kg ], i.p., every other day 2 times administration) mouse origin by various ratios (1:0. 1-1:1) to the stopping-power mouse to the burn induction suppressor cell of the contra suppressor cell guided by <8> glycyrrhizin, contra suppressor activity was measured in MLR. Consequently, the contra suppressor cell of tales doses was required to remove thoroughly the control activity of a burn mouse origin suppressor cell (table 5).

[0070]

[A table 5]

火傷誘発抑制 細胞の数	グリチルリチン誘導コントラ サプレッサー細胞の数	コントラサプレッサー 活性 (%)
	0	—
1 × 1 0 <sup>5</sup>	1 × 1 0 <sup>4</sup>	2 0
	5 × 1 0 <sup>4</sup>	2 0
	1 × 1 0 <sup>5</sup>	8 0
	0	—
5 × 1 0 <sup>5</sup>	5 × 1 0 <sup>5</sup>	7 8
	0	—
1 × 1 0 <sup>5</sup>	1 × 1 0 <sup>5</sup>	2 0
	5 × 1 0 <sup>5</sup>	5 0
	1 × 1 0 <sup>6</sup>	7 5

[0071] In addition, it was the same even if it used the physiological saline solution which added the cysteine and the glycine to glycyrrhizin.

[0072]

[Example] Below, the example of this invention is explained.

[0073]

[Example(s) of Production]

Let mixture of the <example 1 of pharmaceutical preparation> tablet following presentation be a tablet with a conventional method.

Glycyrrhizin 25mg Potatostarch 220mg Magnesium stearate 5mg ————— \*\*

Total 300mg [0074] Let mixture of the <example 2 of pharmaceutical preparation> sugar-coated tablet following presentation be a sugar-coated tablet with a conventional method.

Glycyrrhizin 25mg A glycine 25mg A methionine 25mg A calcium carbonate Optimum dose A lactose Optimum dose Carboxymethyl cellulose Optimum dose ————— \*\* Total 300mg

[0075] <Example 3 of pharmaceutical preparation> injections glycyrrhizin 200mg is dissolved in a physiological saline, and it may be 100ml.

[0076] <Example 4 of pharmaceutical preparation> injections glycyrrhizin 200mg, glycine 2000mg, and cysteine 100mg are dissolved in a physiological saline, and it may be 100ml.

[0077]

[Effect of the Invention] By this invention, the contra suppressor cell which controls an operation of a suppressor cell can be guided. Moreover, the opportunistic infection of low immunity \*\*\*\*\*,

septicemia, etc. can be mitigated and treated by guiding a contra suppressor cell.

[0078] Furthermore, by importing into a patient, also to a serious patient, an opportunistic infection can be mitigated and healthy people's contra suppressor cell guided by this invention can be treated.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing showing operation control of the ConA induction suppressor cell by the glycyrrhizin administration mouse origin contra suppressor cell.

[Drawing 2] Drawing showing the suppressor cell appearance inhibition effectiveness of the glycyrrhizin in a burn mouse.

[Drawing 3] Drawing showing the phylaxis effectiveness by the glycyrrhizin induction contra suppressor cell to HSV-1 infection of a burn mouse.

[Drawing 4] Drawing showing the infection curative effect by the glycyrrhizin induction contra suppressor cell to HSV-1 infection of a burn mouse.

[Drawing 5] Drawing showing HSV-1 amount in an organ.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

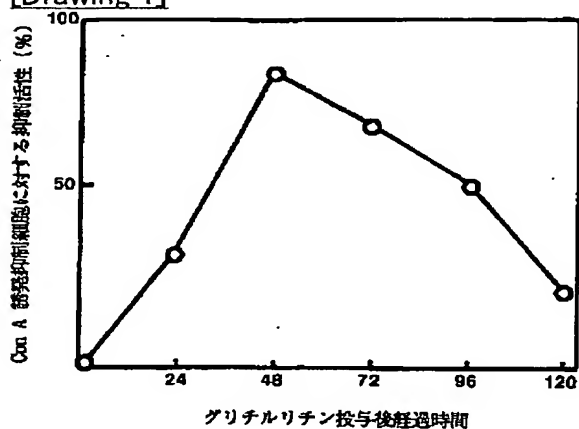
1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

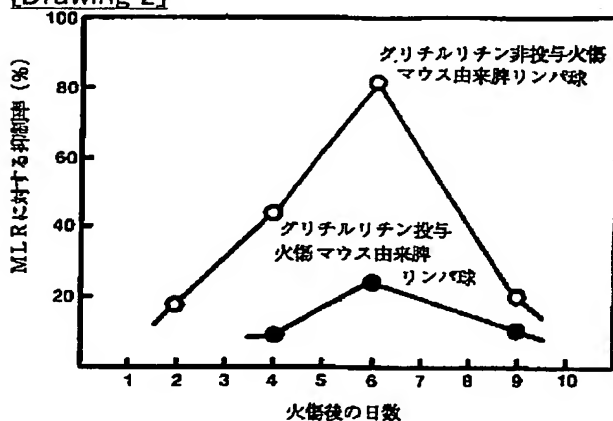
3.In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

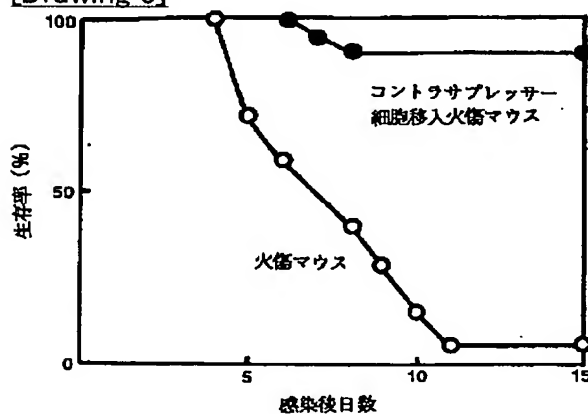
[Drawing 1]



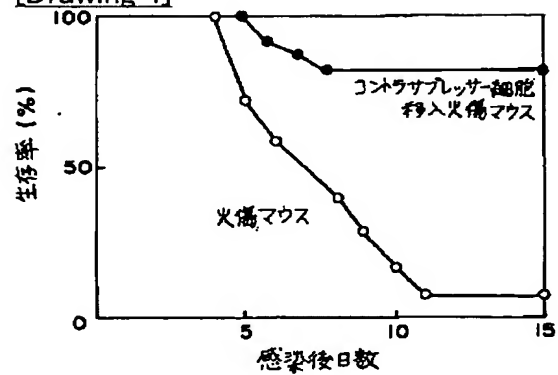
[Drawing 2]



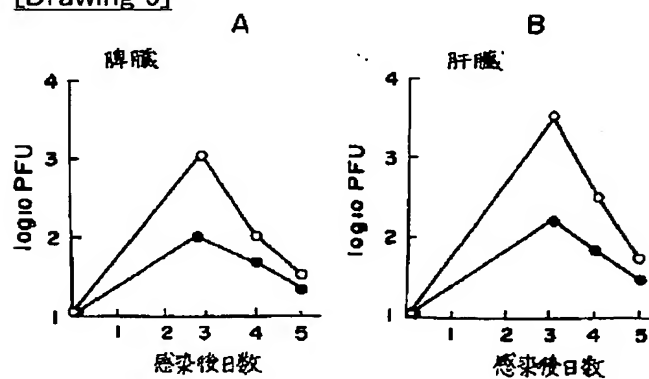
[Drawing 3]



[Drawing 4]



[Drawing 5]



[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-135836

(43)公開日 平成6年(1994)5月17日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

A61K 31/70

識別記号

ABD

AED

庁内整理番号

8314-4C

FI

技術表示箇所

// C07H 15/256

Z

審査請求 未請求 請求項の数3(全12頁)

(21)出願番号 特願平4-290509

(22)出願日 平成4年(1992)10月28日

(71)出願人 000170358

合資会社ミノファーゲン製薬本舗

東京都新宿区四谷3丁目2番地7

(72)発明者 鈴木 富士夫

アメリカ合衆国 テキサス州 77551 ガ

ルベストン市 シャンテリー サークル

7714

(72)発明者 ボラード ビルド リチャード

アメリカ合衆国 テキサス州 77551 ガ

ルベストン市 サン マリノ 168

(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外3名)

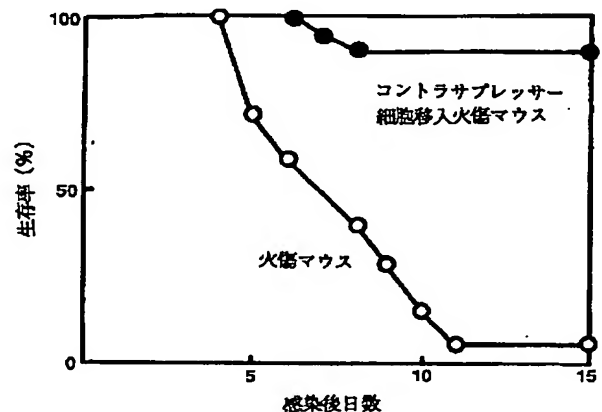
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コントラサプレッサー細胞の誘導剤

(57)【要約】

【目的】 コントラサプレッサー細胞の誘導剤、及び低免疫症の治療剤を提供する。

【構成】 グリチルリチンを有効成分として、薬品基剤に配合する。こうして得られるコントラサプレッサー細胞の誘導剤を投与すると、コントラサプレッサー細胞が誘導される。誘導されたコントラサプレッサー細胞は、低免疫症の要因である抑制細胞の出現及びその作用を抑制し、日和見感染を軽減・治療する。





1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリチルリチンを有効成分とするコントラサプレッサー細胞の誘導剤。

【請求項2】 コントラサプレッサー細胞の誘導を介したグリチルリチンを有効成分とする低免疫症の治療剤。

【請求項3】 健康人でのコントラサプレッサー細胞を誘導し、このコントラサプレッサー細胞を取得し、患者に移入することにより日和見感染を予防又は治療をするために用いる請求項1記載のコントラサプレッサー細胞の誘導剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、コントラサプレッサー細胞の誘導剤、及び低免疫症の治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】低免疫症は、癌などの基礎的疾患、ストレス、大怪我や火傷、臓器移植後の移植拒否剤の使用により、あるいは老化時等に、しばしば誘発されることが知られている（サージェリイ(Surgery) 156, 233 (1983)、イムノロジー・トゥデイ(Immunology Today) 11, 170 (1990)、アドバンスズ・イン・ホスト・ディフェンス・メカニズム(Advances in Host defense Mechanisms) 6, 81 (1986)、トランスプランテーション・プロシディンクス(Transplantation Proceedings) 23, 2175 (1991)および、アドバンスズ・イン・イムノロジー(Advances in Immunology) 29, 287 (1980)等)。

【0003】また細菌やウイルスなどの微生物による感染自体も低免疫症の一因となり、近年大きな問題となっているAIDSは低免疫症が誘引される顕著な例である。ところで、癌や火傷などにより低免疫症に陥った患者血清中からは、通常量に比し明らかに高い量のプロスタグランジンE<sub>2</sub>（アーチブス・オブ・サージェリイ(Archives of Surgery) 123, 293 (1988)、ステロイド（ジャーナル・オブ・バーン・ケア・リハビリテーション(Journal of Burn Care Rehabilitation) 5, 143 (1984)、形質転換増殖因子-β（ジャーナル・オブ・クリニカル・ノムノロジー(Journal of Clinical Immunology) 11, 95(1991)）など様々な液性の免疫抑制物質が見つかり、これらが低免疫症誘引の一因となしていると推定できる。

【0004】さらに、これら低免疫症の患者では、インターフェロン産生能（ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology) 129, 1806 (1982)）、インターロイキン2産生能（クリニカル・エクスペリメンタル・イムノロジー(Clinical Experimental Immunology) 65, 570 (1986)）、あるいは胸腺由来細胞依存の細胞殺傷作用（トランスプランテーション(Transplantation) 33, 422 (1982)）、ナチュラルキラー細胞依存の細胞殺傷作用（セルラー・イムノロジー(Cellul ar Immunorogy) 86, 551 (1984)）などの免疫反応を低

2

下せしめる機能を有する抑制細胞（抑制マクロファージ、抑制Tリンパ球、抑制Bリンパ球）が出現し、低免疫症誘引に重要な役割を呈している。

【0005】例えば、抑制細胞が宿主の腫瘍抵抗性を著しく抑制する事実は、Northら（ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(Journal of Experimental Medicine) 159, 1295 (1984)）の拒癌マウスを使った実験で明らかである。すなわち、マウスの同種移植系でMeth A 腫瘍を用いた場合、移植後9日後をピークに随伴免疫を司る抗腫瘍エフェクター細胞が検出されるが、その後は抑制細胞の出現によりエフェクター細胞の活性が排除され、その結果として更に激しい腫瘍の増殖が進行する。

【0006】一方、臓器移植の場合には、移植された臓器に対する拒否反応を抑制するために、サイクロスポリンA（トランスプランテーション・プロシディンクス(Transplantation Proceedings) 23, 2180 (1991)）、0KT3（ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(The New England Journal of Medicine)313, 337 (1985)）などの免疫抑制剤が開発され、臨床の場で利用できるようになったので、臓器移植患者の生存日数は確実に伸長している。

【0007】しかしながら、これら免疫抑制剤により、T細胞の抑制（ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology) 128, 355 (1982)）や抑制T細胞の誘導（クリニカル・アンド・エクスペリメンタル・イムノロジー(Clinical and Experimental Immunology) 71, 369 (1988)）が促され、その結果として患者の細胞性免疫が顕著に低下し、やがて常在菌や空中雑菌ですら排除できなくなり、多くの場合患者は敗血症などで死に至る。

【0008】火傷では、その物理的損傷による直接的な死は、呼吸および水分管理などを含めた現代治療医学の進歩により殆ど回避できるようになったものの、低免疫症により併発する日和見感染が原因となる敗血症などによる死が大きな問題となっている。

【0009】火傷マウス由来の抑制細胞を、非火傷マウスに移入すると、移入されたマウスのヘルペスウイルスに対する感染感受性が顕著に増大することから、火傷宿主のヘルペスウイルス感染に対する感染感受性の上昇は、火傷マウス脾に存在する抑制T細胞に依存することが確かめられた。

【0010】クッパーら（ジャーナル・オブ・サージカル・リサーチ(Journal of Surgical Research) 38, 606 (1985)）が敗血症モデルを用いて行った動物実験では、抑制細胞（Lyt2<sup>+</sup> T細胞）の移入は、本モデルでの平均死亡率15%を92%にまで上昇させた。また、この際抑制細胞が産生する抑制因子に対する単一抗体を同時に投与すると、この様な死亡率の上昇は認められなかった。この事実は、抑制細胞の日和見感染誘引における重

要性を明白にし、更に抑制細胞やその可溶性因子の働きを阻止すれば、火傷宿主の感染抵抗性を非火傷の状態にまで引き戻すことが出来る事を物語る。

#### 【0011】

【発明が解決しようとする課題】低免疫症個体から、その一因となっている抑制細胞を取り除くため、これまでに、X線照射（キャンサー・イムノロジー・アンド・イムノセラピー（Cancer Immunology and Immunotherapy）16, 175（1984））、トピカル セリウム ナイトレイト（サージェリイ（Surgery）99, 53（1986））、メルフェラン（キャンサー・イムノロジー・アンド・イムノセラピー（Cancer Immunology and Immunotherapy）20, 209（1985））やサイクロフォスファミド（ネイチャー（Nature）262, 77（1976））などのアルキル化剤、シメチジン（ザ・ジャーナル・オブ・トラウマ（The Journal of Trauma）25, 131（1985））やラニチジン（ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー（The Journal of Immunology）132, 3054（1984））などのヒスタミンの2型受容体阻害剤、プロスタグランジンE<sub>2</sub>産生阻害作用を示すインドメタシン（ジャーナル・オブ・バイオロジカル・レスポンス・モディファイヤーズ（Journal of Biological Response Modifiers）7, 568（1988））、アスピリン（ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー（British Journal of Cancer）38, 503（1978））、イブプロフェン（サージェリイ（Surgery）97, 721（1985））などの非ステロイド系抗炎症薬、その他ポリミキシンB（ジャーナル・オブ・バーン・ケア・リハビリテーション（Journal of Burn Care Rehabilitation）10, 213（1989））、アクラシノマイシンA（イムノファーマコロジー（Immunopharmacology）10, 19（1985））、ヘパタミノールAMP（ジャパニ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー（Japan Journal of Pharmacology）48, 417（1988））、プロカイナミド（クリニカル・アンド・インベスティガティブ・オブ・メディスン（Clinical and Investigative of Medicine）11, 425（1988））、リビドA誘導体（インフェクション・アンド・イムニティ（Infection and Immunity）56, 1076（1988））、OK-432（インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー（International Journal of Cancer）26, 401（1980））など多くの方法や物質が諸々の実験系において取り上げられて来た。

【0012】しかしながら、抑制細胞を取り除くために開発された従来の方法は、ある程度の効果は評価できものの、いづれも未だ不完全で、その他の効果的な方法の開発が強く望まれている。

【0013】ところで、抑制細胞の活性を効果的に、絶対的に抑制するものとして、抑制細胞のブロッカー細胞であるコントラサプレッサー細胞が報告されている（アドバンシス・イン・キャンサー・リサーチ（Advances in Cancer Research）42, 277（1984））。このコントラサ

プレッサー細胞は、抑制細胞が原因で誘発される1型ヘルペスウィルス（HSV-1）の日和見感染症に著効を示す。例えば、火傷マウスに10LD<sub>50</sub>量のHSV-1を腹腔感染させる1日前に、コントラサプレッサー細胞を静脈より移入すると、火傷マウスの95%が生存した。

【0014】本発明は、上記観点からなされたものであり、低免疫症患者の日和見感染等を効果的に軽減、治療するために、抑制細胞を取り除くことを目的とし、コントラサプレッサー細胞の誘導剤、及び日和見感染の軽減又は治療剤等、低免疫症の治療剤を提供することを課題とする。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、グリチルリチンがコントラサプレッサー細胞を誘導する作用を有し、誘導されたコントラサプレッサー細胞により日和見感染を軽減、治療することができることを見出し、本発明に至った。

【0016】すなわち本発明は、グリチルリチンを有効成分とするコントラサプレッサー細胞の誘導剤、及びグリチルリチンを有効成分とする低免疫症の治療剤である。

【0017】以下、本発明を詳細に説明する。

<1>コントラサプレッサー細胞の誘導剤、低免疫症の治療剤

本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤、あるいは低免疫症の治療剤は、グリチルリチンを有効成分とする。

【0018】グリチルリチンは、甘草由来のサポニンであり、1分子のグリチルレチン酸に2分子のグルクロン酸が結合した構造を有し、急性および慢性毒性が極めて低いことが特徴である。またグリチルリチンは、インターフェロン $\gamma$ 産生能などの宿主の免疫機構を増殖させる作用、宿主機能を介して発現される抗腫瘍効果や抗ウィルス効果を有し、慢性肝炎の治療薬として現在広く臨床の場で使用されている。

【0019】本発明においては、剤型として、製薬上許容される無害の一種、あるいは数種の賦形剤、例えば、乳糖、バレイショデンプン、アルギン酸ナトリウム、又はアミノ酢酸、スレオニン、炭酸カルシウム等を配合した散剤、顆粒剤、糖衣錠、及びカプセル剤とすることができる。注射剤の場合、溶媒は単に注射蒸留水又は生理食塩水のみ、あるいは解毒アミノ酢酸等のアミノ酸を添加してもよい。

【0020】グリチルリチンは、注射用製剤として、システインとグリシンを加えた生理食塩水溶液が知られているが、本発明に好適に使用することができる。

#### 【0021】<2>用法

本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤の投与量は、経口投与では、成人1日当たり200～400mg

10

20

30

40

50

g、非経口投与では成人1日当たり10～200mgの範囲で用いることにより、所期の効果が期待できる。

【0022】また、重度の患者においては、本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤、あるいは低免疫症の治療剤を投与しても、コントラサプレッサー細胞の効果的な誘導は、期待できない場合がある。そのような場合は、コントラサプレッサー細胞誘導剤を健常人に投与し、誘導されたコントラサプレッサー細胞を含む血液を低免疫症患者に輸血し、あるいはリンパ球画分を能動的トランスファーすることにより、日和見感染を軽減、治療することができる。

【0023】

【作用】以下に、本発明のコントラサプレッサー細胞の誘導剤及び低免疫症の治療剤の作用を説明する。

【0024】＜1＞グリチルリチンのコントラサプレッサー細胞誘導効果

グリチルリチンのコントラサプレッサー細胞誘導作用を動物実験により説明する。

【0025】コントラサプレッサー細胞は、ビシア ヴィロサ レクチン(VVレクチン)に特異的に付着する性質を有する(ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(European Journal of Immunology) 11, 937(1981)) ので、グリチルリチン投与動物のVVレクチン付着性細胞数の変化を調べた。

【0026】グリチルリチンを腹腔内(i.p.)投与した48時間後のマウス、ラット、モルモット由来脾リンパ球( $5 \times 10^7$ 個)を、VVレクチン( $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、2時間)処理を施した直径9cmのプラスチックシャーレに添加し、37℃、45分間培養した。レクチン非付着性細胞を除去した後、N-アセチル-D-ガラクトサミン( $1 \text{ mg/ml}$ )をシャーレに添加し、さらに15分間培養を続けることにより、VVレクチン付着性細胞をプレートから剥し、トリパンブルー染色法で生細胞数を血球計算盤にて計測した。結果を表1に示す。

【0027】

【表1】

7		8			
	用量 (mg/kg)	投与 経路	動物	付着細胞数 ( $\times 10^4$ /動物)	付着率 (%)
<b>実験1</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×1	ip	マウス	150	15
<b>実験2</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	0.1×1	ip	マウス	100	10
	100 ×1	ip	マウス	200	20
<b>実験3</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×1	sc	マウス	150	15
	10×1	iv	マウス	150	15
	10×1	po	マウス	150	15
<b>実験4</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×1	ip	マウス	100	10
	10×5	ip	マウス	150	15
	10×10	ip	マウス	200	20
<b>実験5</b>					
コントロール			マウス	<1	—
グリチルリチン	10×2	ip	マウス	200	—
強ミノC	10×2	ip	マウス	200	20
<b>実験6</b>					
コントロール			ラット	<1	—
グリチルリチン	10×2	ip	ラット	1000	20
<b>実験7</b>					
コントロール			モルモット	<1	—
グリチルリチン	10×2	ip	モルモット	3200	20

【0028】この結果から明らかなように、グリチルリチン投与マウス由来の脾リンパ球中に、VVレクチン付着性細胞の顕著な増加を認めた。また、対照の生理食塩水投与群ではVVレクチン付着性細胞は殆ど検出されなかった。このことから、グリチルリチン投与により脾リンパ球中にコントラサプレッサー細胞が誘導されることが確認された。

【0029】同様の結果は0.1～100mg/kg量をラットやモルモットに腹腔内、s.c.（皮下）あるいはp.o.（経口）投与した際にも認められた。又グリチルリチンの連続投与を試みたところ、レクチン付着性細胞は薬剤の投与回数に依存して増加することが認められた。

【0030】<2>グリチルリチンにより誘導されたコントラサプレッサー細胞による抑制細胞を抑制する作用

（1）Con A誘発抑制細胞に対する作用  
はじめに、コントラサプレッサー細胞が、Con Aにより誘発される抑制細胞を抑制する作用を、リンパ球混合培

養（MLR）系を用いて調べた。

【0031】BALB/cマウス（H-2<sup>d</sup>）由来脾リンパ球 $1 \times 10^6$ 個/mlを、24 $\mu$ g/mlのコンカナバリンA（Con A）で48時間培養することにより、抑制細胞（Lyt2<sup>+</sup> T細胞）を誘導した（アクタ・パソロジカ・マイクロバイオリジカ・イムノロジカ・スカンジナビア（Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica, Scandinavia, section C, 9, 277（1982））。

【0032】96穴マイクロプレートを用い、反応細胞（BALB/cマウス由来リンパ球、 $1 \times 10^5$ 個/穴）と刺激細胞（C57BL/6マウス由来リンパ球）の一方MLRに、得られた抑制細胞とグリチルリチン投与（10mg/kg, i.p.）したBALB/cマウスより得られた脾リンパ球（コントラサプレッサー細胞）を2:2:1:2の比率で加え、37℃で5日間、5%CO<sub>2</sub>ふ卵器内で培養した。

【0033】培養終了24時間前に、1 $\mu$ Ci/穴のト

リチウムチミジン ( $^3\text{H-TdR}$ ) を添加した後、反応細胞への $^3\text{H-TdR}$ の取り込み量を液体シンチレーションカウンターにより測定することにより、抑制細胞の作用抑制を調べた。下記式により得られる抑制率を、図1に示した。

【0034】抑制細胞活性の抑制率(%) =  $[1 - (\text{抑制細胞添加群のCPM} / \text{抑制細胞にグリチルリチン投与マウス由来脾リンパ球を添加した群のCPM})] \times 100$

【0035】その結果、グリチルリチンを投与したマウスより得られた脾リンパ球は、ConAにより誘発されたMLRの抑制活性を50~70%阻害した。同様の結果は、グリチルリチン投与マウス由来脾リンパ球あるいは未梢血中リンパ球でも認められ、ラットおよびモルモットに0.1~100mg/kgのグリチルリチンをs.c.、i.v. およびp.o.投与した際にも確認された。

【0036】(2) 火傷誘発抑制細胞に対する抑制作用次に、火傷により誘発される抑制細胞を用い、コントラ\*

\* サプレッサー細胞が抑制細胞を抑制する作用を調べた。

【0037】火傷(体表面積の30%、3度)を施したBALB/cマウス由来脾リンパ球(火傷6日後、 $1 \times 10^6$ 個)と、同系マウス由来脾リンパ球(反応細胞、 $1 \times 10^5$ )と、異系マウス(C57BL/6)由来脾リンパ球(刺激細胞)の三者で一方向MLRを行い、MLRを制御する抑制細胞活性を調べた(イムノロジー・レターズ(Immunology Letters) 19, 33 (1988))。さらに、コントラサプレッサー細胞の活性を測定するために、反応細胞と刺激細胞と抑制細胞に対し、グリチルリチン投与(10mg/kg, i.p.)マウスより得た脾リンパ球を1:1:10:10:1の比率で加え、培養した。

【0038】前述の如く培養した後、反応細胞への $^3\text{H-TdR}$ の量を測定することにより火傷誘発抑制細胞の作用抑制を測定した。抑制率を表2に示す。

【0039】

【表2】

反応細胞と刺激細胞が 混合培養された細胞	抑制率 (%)
正常マウス由来脾リンパ球 (NSMNC)	—
火傷マウス由来脾リンパ球 (BSMNC)	80
グリチルリチン投与正常マウス由来脾リンパ球 (GR NSMNC)	—
グリチルリチン投与火傷マウス由来脾リンパ球 (GR BSMNC)	27
NSMNC + GR BSMNC	—
BSMNC + GR BSMNC	30

【0040】その結果、グリチルリチンを投与したマウスより得られた脾リンパ球により、火傷誘発抑制細胞の活性が50~80%阻止された。すなわち、グリチルリチン投与マウス由来脾細胞中にコントラサプレッサー細胞が誘導され、このコントラサプレッサー細胞により抑制細胞の作用が抑制された。

【0041】以上の結果から、コントラサプレッサー細胞は、Con A及び火傷のいずれにより誘発される抑制細胞に対しても、抑制する作用を有することが示された。

【0042】<3>グリチルリチンによる抑制細胞出現阻止作用

(1) 火傷動物に対する抑制細胞出現阻止作用  
BALB/Cマウスに火傷(体表面積の30%、3度)を施し、2日後および4日後に、グリチルリチンを腹腔内投与(10mg/kg)した。グリチルリチン投与あるいはグリチルリチン非投与の火傷マウスから経日的に得られた脾リンパ球を、同系マウス由来脾リンパ球(反応細胞)と異系マウス由来脾リンパ球(刺激細胞)の三者で一方向MLRを行った。MLRは、反応細胞( $1 \times 10^5$ 個)に対し、刺激細胞とグリチルリチン投与火傷マウス由来脾リンパ球を1:1:10の比率で混合し、37℃で5日

間、5%CO<sub>2</sub>ふ卵器内で行った。前記と同様に抑制率を算出し、図2に示した。

【0043】その結果、グリチルリチン非投与の火傷マウスから経時的に得られた脾リンパ球(○)は、火傷4日目よりMLRを有意に抑制し始め、その活性は火傷6日目にピークに達し(60~80%抑制)、11日後には消失した。他方グリチルリチン投与火傷マウス由来脾リンパ球(●)は、同様のMLRを最大でも30%抑制(火傷6日後)するにすぎず、グリチルリチンにより火傷誘発の活性が顕著に阻止された。

【0044】また、このような脾リンパ球の効果は、V<sub>V</sub>レクチン付着性細胞を除去した時には消失したことから、グリチルリチン投与マウスで抑制細胞の活性が低いという結果は、グリチルリチンによりコントラサプレッサー細胞が誘導された事に起因するものである事が確認された。

【0045】(2) アロ抗原で誘導される抑制細胞阻止効果

BALB/c(H-2<sup>d</sup>)マウスを、マウス当り $5 \times 10^7$ 個のEL-4腫瘍細胞(H-2<sup>d</sup>)で免疫すると、アロ抗原反応性の抑制細胞が誘導される。グリチルリチンを投与(10mg/kg、

i.p.)したBALB/cマウスに同様の方法でアロリンパ球を移入し、得られた脾リンパ球をMLR系に添加した。培養後、反応細胞への<sup>3</sup>H-TdRの量を測定することによりアロ抗原反応性抑制細胞の量を測定した。

【0046】その結果、アロリンパ球を移植した時、抑制細胞の活性は移入3日目より検出され(30~50%抑制)、5~7日目をピークに(70~80%抑制)、9日目までに消失した。10mg/kgのグリチルリチンで処理したマウスに同様の方法でアロリンパ球を移植すると、上述の如くには抑制細胞活性が検出されず、ピークと見られる5日目でも抑制細胞の抑制率は20~40%にすぎなかった。

【0047】すなわち、グリチルリチンは火傷のみならずアロ抗原により誘導される抑制細胞に対しても出現を阻止する作用を有することが確かめられた。この事実はすでに雑誌で発表されている(医学のあゆみ、158巻、135頁(1991))が、コントラサプレッサー細胞の関与、コントラサプレッサー細胞がグリチルリチンにより誘導されることについては、記載されていない。

【0048】(3) 担癌動物における抑制細胞出現阻止作用

BALB/cマウスの左腹部にマウス当り $1 \times 10^5$ 個のMeth A腫瘍細胞を移植した7~10日後に再度同量の腫瘍細胞を右腹部に移植しても、随伴免疫のため2次移植腫瘍\*

\*の増殖は認められない。これに対し移植20日後に同様の条件で腫瘍の再移植を試みると、腫瘍の増殖に伴って出現した抑制細胞の働きにより随伴免疫が破壊され、2次移植腫瘍の増殖が認められる(ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メデイシン(Journal of Experimental Medicine) 159, 1295 (1984))。

【0049】同様の実験系で、腫瘍細胞を1次移植した7日目に、グリチルリチン(10mg/kg, i.p.)を頻回投与した別のマウスより得られた脾細胞を移入し、その13日後に担癌マウスから得られた脾リンパ球中の抑制細胞の活性をMLRにより測定した。

【0050】鼠径部皮下に $1 \times 10^5$ 個のMeth A腫瘍を移植した7日目のBALB/c担癌マウスに、同系正常マウスにグリチルリチン投与(10mg/kg, i.p., 1日おきに2回)により得られた脾細胞(マウス当り $1 \times 10^6$ 個)を静脈より移入した。尚、対照群には、担癌7日後のマウスに正常マウスより得られた脾細胞を同じく移入した。腫瘍移植20日目にそれぞれ得た担癌マウス由来脾リンパ球の抑制細胞活性を、前記<3>(1)と同様に、5日間培養の一方MLRにより測定した。結果を表3に示す。

【0051】

【表3】

反応細胞と刺激細胞が 混合された細胞	MLRに対する抑制率 (%)
正常マウス由来脾細胞を移入された 担癌マウス脾リンパ球	80
グリチルリチン投与マウス由来脾細胞を移入された 担癌マウス脾リンパ球	20

【0052】その結果、グリチルリチン非投与の担癌マウス由来脾リンパ球がMLRを80%抑制したのに対し、グリチルリチン投与マウス由来脾細胞を移入された担癌マウスのそれでは、MLRは20%しか抑制されなかった。

【0053】すなわち、グリチルリチン投与マウス由来脾細胞中には、1次腫瘍移植によって誘導される抑制細胞を排除する作用が存在する訳である。しかし当該脾細胞よりVVレクチン付着性細胞を除去するとその活性も失われることから、グリチルリチンによる抑制細胞抑制作用が、コントラサプレッサー細胞の誘導を介して生じた現象であることが確認された。

【0054】<4>グリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞による感染軽減作用  
火傷動物のHSV-1感染に対するグリチルリチンの作用を調べた

火傷直後のマウスにHSV-1を感染させ、同時にグリチルリチン(10mg/kg, i.p.)を投与あるいはグリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞を移入し、マウスの生存を観察した。

【0055】BALB/cマウスに火傷(体表面積の30%、3度)を施した2時間後、グリチルリチンを投与(10mg/kg  $\times$  2, i.p.)することにより誘導したコントラサプレッサー細胞( $1 \times 10^6$ 個/マウス)を、火傷マウスに静脈より移入した。火傷マウス(○)およびコントラサプレッサー細胞の移入を受けた火傷マウス(●)に、火傷マウスの95%が感染死する量のHSV-1を腹腔に感染させ、15日間マウスを観察した。結果を図3に示す。

【0056】その結果、グリチルリチンの投与により全体の90%の火傷マウスがHSV-1による感染死を免れた。又同様のHSV-1感染火傷マウスに、グリチルリチン

により誘導したコントラサプレッサー細胞を能動的に静脈移入すると、その死亡率が10%まで低下した。脾細胞の能動移入の前にVVレクチン付着性細胞画分を除去するとこの様な活性が消失する事から、グリチルリチンによるHSV-1感染火傷マウスの防御は、グリチルリチンにより誘導されたコントラサプレッサー細胞を介して生じた現象であることが確かめられた。

【0057】以上説明したように、グリチルリチンはコントラサプレッサー細胞を誘導する作用を有し、コントラサプレッサー細胞を介して、抑制細胞の作用を抑制し、また抑制細胞の出現を阻止する作用を有し、さらに、その結果、感染を阻止する作用を有する。

【0058】＜5＞グリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞による感染治療作用

火傷直後のマウスにHSV-1を感染させ、その24時間後にグリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞を移入し、マウスの生存を確認した。

【0059】BALB/cマウスに火傷を施した2時間後、火傷マウスの95%が感染死する量のHSV-1を腹腔に感染させ、その1日後にBALB/c normalマウスにグリチルリチンを投与(10mg/kg, i.p.)することにより誘導したコントラサプレッサー細胞(1×10<sup>8</sup>個/マウス)を、HSV-1感染火傷マウスに静脈より移入し、15日間マウスを観察した。結果を図4に示す。

【0060】また、感染3、4、5日後に脾臓および肝臓を摘出し、臓器内のウイルス量を、VERO細胞を用いたブランク法により定量した。結果を図5に示す

(A:脾臓、B:肝臓)。

【0061】その結果、グリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞の移入により、80%の火傷マウスがHSV-1による感染死を免れた(図4)。また、グリチ

ルリチン誘導コントラサプレッサー細胞を移入された感染火傷マウスは、感染後の脾臓および肝臓中のウイルス量が、非移入群と比較して著しく減少していた(図5)。

【0062】以上説明したように、グリチルリチンにより誘導されるコントラサプレッサー細胞には、抑制細胞の作用を抑制し、その結果感染を治療する作用を有する。尚、グリチルリチンにシステインとグリシンを加えた生理食塩水溶液を用いた場合も、以上と同様の作用を有する。

【0063】＜6＞グリチルリチンで誘導されるコントラサプレッサー細胞の性状

グリチルリチンで誘導されたコントラサプレッサー細胞の性状を調べた。グリチルリチン投与(10mg/kg, i.p., 1日おきに2回)マウスより得た脾リンパ球を、各種単一抗体(4℃、40分)と補体(37℃、40分)で処理した。処理方法は、イムノロジー・レターズ(Immunology Letters 19, 33頁(1988)記載の方法に従った。

【0064】これらの処理細胞(1×10<sup>6</sup>個)と火傷誘発抑制細胞(火傷6日後、1×10<sup>6</sup>個)とを、＜2＞(1)と同様に5日間培養のone-way システムのMLRに添加し、抑制細胞の活性に対する阻止活動を指標にその性状を検討した。その結果、グリチルリチンで誘導されるコントラサプレッサー細胞はCD3、L3T4単一抗体で感受性で、Ly 2.2単一抗体に非感受性であり、CD3陽性、CD4陽性、CD8陰性のT細胞である事が判明した(表4)。

【0065】

【表4】

グリチルリチン誘発コントラ サブレッサー細胞の処理	火傷誘発抑制細胞 に対する制御率 (%)
補体のみ	75
anti CD3 単一抗体 + 補体	0
anti L3T4 単一抗体 + 補体	1
anti Lyt 1.2 単一抗体 + 補体	0
anti Lyt 2.2 単一抗体 + 補体	76
anti Ig 抗血清 + 補体	76
火傷誘発抑制細胞の処理	処理後に残存した 抑制細胞の活性 (%)
補体のみ	80
anti CD3 単一抗体 + 補体	1
anti L3T4 単一抗体 + 補体	81
anti Lyt 1.2 単一抗体 + 補体	82
anti Lyt 2.2 単一抗体 + 補体	2
anti Ig 抗血清 + 補体	78

【0066】尚、グリチルリチンにシステインとグリシンを加えた生理食塩水溶液を用いても、同様であった。

【0067】＜7＞火傷により誘発される抑制細胞の性状

火傷6日目のマウス由来脾リンパ球を細胞表面マーカーに対する各種単一抗体および補体で処理した後、抑制細胞の性状をMLRにて検討した。その結果、火傷誘発抑制細胞は、CD3およびLyt 2.2単一抗体に感受性で、L3T4単一抗体に非感受性であり、CD3陽性、CD4陰性、CD8陽性のT細胞であることが判明した(表4)。これはすでに雑誌で報告されている結果と同様である(ジャーナル・オブ・サージカル・レサーチ(Journal of Surgical Research) 38, 606 (1985))。

【0068】尚、グリチルリチンにシステインとグリシ

ンを加えた生理食塩水溶液を用いても、同様であった。

【0069】＜8＞グリチルリチンで誘導したコントラサブレッサー細胞の火傷誘発抑制細胞に対する阻止能  
マウスに、グリチルリチン処理(10mg/kg, i.p., 1日おきに2回投与)マウス由来の脾コントラサブレッサー細胞と、火傷誘発抑制細胞(火傷6日後)とを様々な比率(1:0.1~1:1)で混合した後、MLRにてコントラサブレッサー活性を測定した。その結果、火傷マウス由来抑制細胞の抑制活性を完全に除去するには同量のコントラサブレッサー細胞が必要であった(表5)。

【0070】

【表5】



17	18
火傷誘発抑制 細胞の数	グリチルリチン誘導コントラ サプレッサー細胞の数
	0
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$
	$5 \times 10^4$
	$1 \times 10^5$
	0
$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$
	0
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$
	$5 \times 10^5$
	$1 \times 10^6$

【0071】尚、グリチルリチンにシステインとグリシンを加えた生理食塩水溶液を用いても、同様であった。

【0072】

【実施例】以下に、本発明の実施例を説明する。

グリチルリチン

バレイシヨデンブン

ステアリン酸マグネシウム

\* 【0073】

【製剤例】

20 <製剤例1>錠剤

\* 下記組成の混合物を常法により錠剤とする。

25mg

220mg

5mg

合 計

300mg

【0074】<製剤例2>糖衣錠

\* ※ 下記組成の混合物を常法により糖衣錠とする。

グリチルリチン

25mg

グリシン

25mg

メチオニン

25mg

炭酸カルシウム

適量

乳糖

適量

カルボキシメチルセルロース

適量

合 計

300mg

【0075】<製剤例3>注射剤

グリチルリチン200mgを生理食塩水に溶解し、100mlとする。

【0076】<製剤例4>注射剤

グリチルリチン200mg、グリシン2000mg、システイン100mgを生理食塩水に溶解し、100mlとする。

【0077】

【発明の効果】本発明により、抑制細胞の作用を抑制するコントラサプレッサー細胞を誘導することができる。また、コントラサプレッサー細胞を誘導することにより、低免疫症患者の日和見感染、敗血症等を軽減、治療することができる。

【0078】さらに、本発明により誘導された健常人のコントラサプレッサー細胞を、患者に移入することによ

って、重度の患者に対しても日和見感染を軽減、治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 グリチルリチン投与マウス由来コントラサプレッサー細胞によるConA誘発抑制細胞の作用抑制を示す図。

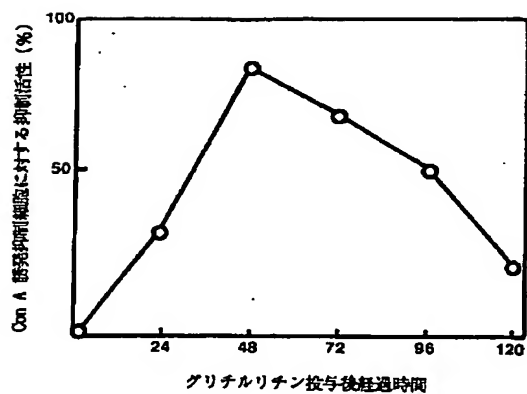
【図2】 火傷マウスにおけるグリチルリチンの抑制細胞出現阻止効果を示す図。

【図3】 火傷マウスのHSV-1感染に対するグリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞による感染防御効果を示す図。

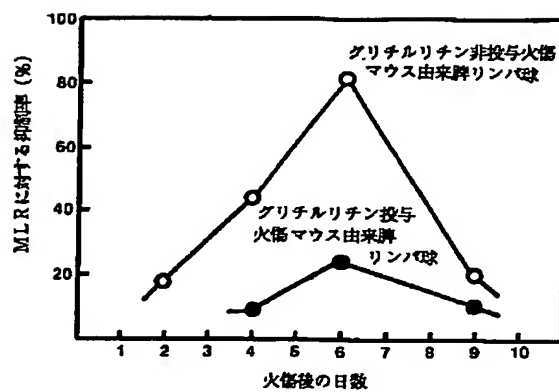
【図4】 火傷マウスのHSV-1感染に対するグリチルリチン誘導コントラサプレッサー細胞による感染治療効果を示す図。

【図5】 臓器中のHSV-1量を示す図。

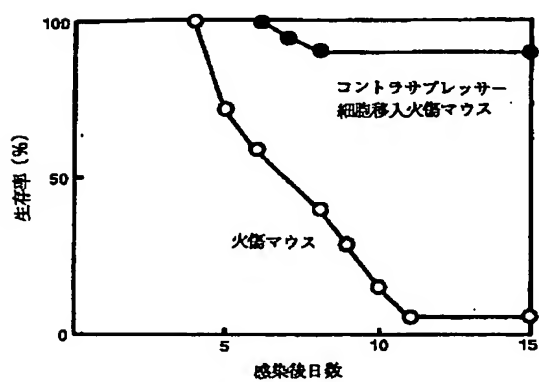
【図1】



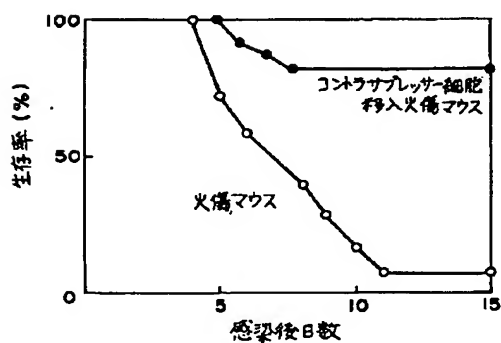
【図2】



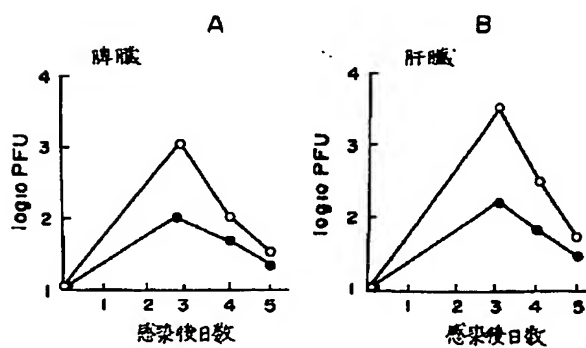
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 小林 真紀子  
アメリカ合衆国 テキサス州 77550 ガ  
ルベストン市 フェリー ロード 500、  
#414

(72)発明者 宇都宮 徳一郎  
アメリカ合衆国 テキサス州 77551 ガ  
ルベストン市 セントラル シティ プル  
バード 6315、#117  
(72)発明者 宇都宮 恭三  
神奈川県大和市下鶴間4260